ADS-J1对SEVI增强HIV-1初始传播病毒及其慢性控制病毒感染的拮抗作用及机制

柳红妙，麻宁宁，罗 春，袁淑英，刘付励，姚新刚，周春琼，邹 敏
南方医科大学药学院，广东 广州 510515

摘要：目的 探讨精液源性病毒增强因子（SEVI）促进HIV-1初始传播（TF）病毒及其慢性控制（CC）病毒感染的情况，及ADS-J1拮抗SEVI增强病毒感染的作用机制。**方法** 硫磺素T（ThT）实验验证$PAP_{248-286}$能自组装成SEVI淀粉样纤维；扩增1对TF和CC感染性克隆病毒，SEVI分别与TF、CC病毒混合后感染TZM-bl细胞，72 h后测定荧光素酶活性，评价SEVI增强病毒感染的倍数；用不同浓度的ADS-J1处理SEVI，再分别与TF、CC病毒混合后感染TZM-bl细胞，72 h后测定荧光素酶活性，考察ADS-J1对SEVI增强TF和CC病毒感染的拮抗作用；接着用ADS-J1和病毒混合后感染TZM-bl细胞，72 h后测定荧光素酶活性，验证ADS-J1直接的抗病毒作用。最后用不同浓度的ADS-J1处理SEVI，检测其Zeta电位，初步探索ADS-J1拮抗SEVI增强TF和CC病毒感染的作用机制。**结果** ThT实验结果表明$PAP_{248-286}$能自组装成SEVI淀粉样纤维；SEVI可显著促进TF和CC病毒的感染（P<0.05），ADS-J1不仅能显著拮抗SEVI增强TF和CC感染（P<0.05）的作用，还能直接抑制TF和CC感染靶细胞（P<0.05）；ADS-J1能浓度依赖性地中和SEVI所带的正电荷。**结论** SEVI能促进TF和CC病毒的感染，ADS-J1可能通过中和SEVI表面的正电荷来拮抗SEVI增强TF和CC的感染作用。
关键词：精液源性病毒增强因子；初始传播病毒；慢性控制病毒；感染；ADS-J1

ADS-J1 antagonizes semen-derived enhancer of virus infection-mediated enhancement of transmitted founder HIV-1 and its matched chronic control strain infection

LIU Hongmiao, MA Ningning, LUO Chun, YUAN Shuying, LIU Fuli, YAO Xingang, ZHOU Chunqiong, ZOU Min
School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the effect of semen-derived enhancer of virus infection (SEVI) on the infection of transmitted/founder (TF) HIV-1 and its matched chronic control (CC) viruses and the antagonism of ADS-J1 on SEVI-mediated enhancement of TF and CC virus infection *in vitro*. **Methods** $PAP_{248-286}$ self-assembling into SEVI amyloid fibrils was validated by ThT assay. We generated the virus stocks of TF and CC virus pair. TZM-bl cells were infected with the mixture of SEVI and TF or CC viruses for 72 h. Luciferase activity was used to observe the enhancement of SEVI. SEVI was treated with different concentrations of ADS-J1 and incubated with TF or CC viruses. TZM-bl cells were then infected with the mixture and luciferase activity was detected 72 h after infection to analyze the antagonism of ADS-J1 on the enhancing effect of SEVI. ADS-J1 was also incubated with TF and CC viruses directly and TZM-bl cells were infected for 72 h to evaluate the antiviral effect using luciferase assay. SEVI was treated with ADS-J1 and Zeta potential was determined to explore the antagonistic mechanism of ADS-J1. **Results** ThT assay showed that $PAP_{248-286}$ was capable of self-assembly into SEVI amyloid fibrils. SEVI significantly accelerated TF and CC viruses infection (P<0.05), and ADS-J1 not only significantly antagonized the enhancement of SEVI (P<0.05) but also directly inhibited the infection of TF and CC viruses (P<0.05). ADS-J1 neutralized the positive charge of SEVI in a dose-dependent manner. **Conclusions** SEVI promotes the infection of TF and CC strains, and ADS-J1 antagonizes SEVI-mediated enhancement of TF and CC viruses by neutralizing the positive charge of SEVI.
Keywords: semen-derived enhancer of virus infection; transmitted founder virus; chronic control virus; infection; ADS-J1

Ⅰ型人类免疫缺陷病毒（HIV-1）是导致获得性免疫缺陷综合征（AIDS）的元凶。HIV-1性传播是一个低效的传播途径，据报道，无任何保护措施的阴道性交的感染率大约为1/1000-1/10000[1-2]，然而，约80%性传播案例都是由单个HIV-1变异毒株建立的新感染[3-5]，这种病毒被称为初始传播（TF）病毒。研究表明[6-8]，相对于HIV-1慢性感染患者血液中的病毒多样性，急性感染者血液内检测到的HIV-1病毒具有高度同源性，这说明“黏膜瓶颈”导致传播过程中病毒遗传多样性的显著减少，并在生殖道局部先天免疫反应的选择压力下，选择出少数能增加传播适应性的优势变异株。而存在于慢性感染患者体内的病毒准种与这种优势变异株（TF病毒）相对应，称之为慢性控制病毒（CC病毒）。对急性感

染者及其匹配的慢性控制者的病毒序列分析发现，具有更近祖上基因的病毒会优先传播[9]，该共有序列代表着启动感染的病毒基因组的一部分。TF病毒是建立新感染的病毒株，只有阻断TF毒株的感染，才能真正防止HIV-1的传播。

德国科学家Münch教授研究发现，精液源性病毒增强因子(SEVI)能显著增强HIV-1感染[10]，这大大提高了HIV-1性传播的几率。一方面，男性感染者精液中的病毒种群主要由少数几种病毒毒株组成，不过精液中病毒滴度最高的毒株往往不是TF病毒，但可以确定的是这些高滴度的普通毒株与SEVI及TF、CC病毒共存于精液中[11]。另一方面，精液作为传播介质，对HIV-1的黏膜传播起着举足轻重的作用。在以往SEVI增加HIV-1感染的研究中发现，SEVI广泛促进CXCR4、CCR5嗜性及双嗜性普通毒株感染靶细胞[12]，但SEVI对TF、CC病毒感染的影响并不清楚。

ADS-J1是我们实验室发现的一个小分子阴离子化合物，具有抑制HIV-1进入靶细胞的作用[12]。本研究中，我们扩增了一对TF及其相匹配的CC克隆病毒，先用SEVI分别与TF、CC混合后感染TZM-bl细胞，后用经ADS-J1处理的SEVI或ADS-J1直接分别与TF、CC病毒共孵后感染TZM-bl细胞，通过荧光素酶实验来检测SEVI对TF、CC病毒感染能力的影响，验证进入抑制剂ADS-J1对TF、CC病毒的直接抗病毒作用，及其对SEVI增强TF、CC病毒感染的拮抗作用。通过测定SEVI与ADS-J1混合处理后的Zeta电位，初步探索ADS-J1拮抗SEVI增强TF、CC病毒感染的作用机制，为HIV-1黏膜传播的机制提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株　293Tx、TZM-bl、CEMx174 5.25M7细胞株均来源于NIHRR；CH236 TF、CH236 CC感染性克隆病毒质粒皆由美国宾夕法尼亚大学Beatrice H. Hahn教授惠赠。

1.1.2 主要试剂　多肽$PAP_{248-286}$(纯度>95%)(北京中科亚光生物科技有限公司)，用PBS配置成10 mg/mL的贮存液于4 ℃冰箱保存；RPMI 1640培养基，DMEM培养基，胰蛋白酶(含0.25% EDTA)，胎牛血清(FBS)，链霉素及青霉素(美国Gibco公司)；硫磺素T(Sigma)；ADS-J1(自主合成)；磷酸盐缓冲液PBS(广州捷倍斯生物科技有限公司)；转染试剂PEI(上海起福生物科技有限公司)；荧光素酶活性检测试剂盒(美国Promega公司)。

1.1.3 实验仪器　CO_2恒温细胞培养箱(美国Thermo公司)，生物安全柜(新加坡ESCO公司)，-80 ℃超低温冰箱(美国Thermo公司)，台式低温高速离心机(德国Eppendorf公司)，Thermomixer恒温振荡仪(德国Eppendorf公司)，Genios Pro型Tecan酶标仪(美国Tecan公司)，倒置光学显微镜(日本Nikon公司)，Zetasizer Nano ZS90(英国Malvern公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 硫磺素T(ThT)实验　多肽$PAP_{248-286}$贮存液用PBS稀释至2.5 mg/mL，于37 ℃、1400 r/min在恒温振荡仪上振荡48 h，使其聚集成为SEVI淀粉样纤维。SEVI溶液梯度稀释(400、200、100、50 μg/mL)，立即加硫磺素T在酶标仪上检测荧光强度。激发波长450 nm(带宽5 nm)，发射波长535 nm(带宽10 nm)。

1.2.2 噻唑蓝(MTT)比色法　生长良好的TZM-bl细胞用胰蛋白酶(含0.25% EDTA)消化后，离心收集细胞，以10^4/孔、100 μL/孔接种于96孔板，37 ℃过夜；次日，每孔加入50 μL新鲜的含10% FBS的DMEM培养基；另加入50 μL不同浓度的SEVI稀释液；继续培养72 h，吸去培养基，每孔加入100 μL的0.5 mg/mL MTT溶液，37 ℃孵育4 h；弃上清，每孔加入150 μL的DMSO溶解紫色结晶，震荡10 min，用酶标仪在570 nm处检测吸光度。每组浓度设置3个复孔。SEVI对CEMx174 5.25M7悬浮细胞的毒性实验也采用类似的方法，采用RPMI 1640培养基(10% FBS，200 μg/mL G418，1 μg/mL嘌呤霉素、青霉素/链霉素)培养，细胞以10^6/孔、150 μL/孔接种于96孔板。培养72 h后，1500 r/min离心5 min，弃去上清，后续步骤同上。

1.2.3 PEI转染法　293Tx细胞以$5×10^5$/mL的密度接种于6孔细胞培养板，每孔接种2 mL，37 ℃过夜；次日，待细胞生长至80%，于转染前2 h更换新鲜的DMEM培养基，将CH236 TF和CH236 CC两种质粒(4 μg/孔)分别与PEI转染试剂(1 μg/μL)按3∶1(质量比)混合，转染293Tx细胞；转染10 h后，弃去上清，加入新鲜的含10% FBS的DMEM培养基；继续培养48 h，离心，收集上清(即病毒原液)，过滤后分装，置于-80 ℃冰箱，备用。

1.2.4 荧光素酶实验　TZM-bl细胞以10^4/孔、100 μL/孔接种于96孔板，37 ℃过夜；次日，CH236 TF和CH236 CC克隆病毒与系列稀释的SEVI溶液按1∶1体积比混合，室温下孵育10 min；混合物以100 μL/孔加入细胞中，只加培养基组作为空白对照，仅加病毒组作为阳性对照；感染3 h后，更换新鲜的含10% FBS的DMEM培养基；继续培养72 h后，按照荧光素酶活性检测试剂盒说明书检测病毒滴度：弃去上清，每孔加200 μL PBS洗板1次，再加入50 μL细胞裂解液，振荡裂解20 min，移取40 μL细胞裂解后的溶液至96孔白色平底微孔板中，每孔加入70 μL荧光素酶底物(预先用水1∶1稀释)，立即用酶标仪测定发光值。每组设置3复孔。ADS-J1对SEVI增强病毒感染的影响也用荧光素酶实验进行评估。ADS-J1系列稀释液与SEVI等体积混合，于37 ℃孵育15 min，5000 r/min离心10 min，弃去上清，用空白

DMEM培养基重悬沉淀，与病毒等体积混合，室温下孵育10 min，其余步骤同上。ADS-J1直接的抗病毒作用同样用荧光素酶实验评估。ADS-J1系列稀释液与病毒等体积混合，室温下孵育10 min，其余步骤同上。仅加病毒、未加ADS-J1组的抑制率当作0，并作为阳性对照组。

1.2.5 Zeta电位检测 ADS-J1系列稀释液(240、120、60、30 μg/mL)与SEVI (400 μg/mL)等体积混合，37 ℃孵育30 min，室温下5000 r/min离心5 min，弃去上清；用1 mL浓度为1mmol的KCl重悬沉淀，室温孵育10 min，将样品倾倒入Zeta电位检测池，使用Zetasizer Nano ZS90电位测定仪检测，每个样品重复检测3次。

1.2.6 统计学分析 直方图均采用Excel进行处理。采用SPSS 22.0软件对实验数据进行统计学分析，实验数据以均数±标准差表示。数据分析采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)，组间两两比较用LSD法，方差不齐则用Dunnett T_3检验法，当P<0.05时差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 $PAP_{248\text{-}286}$在PBS中能自组装成形成SEVI淀粉样纤维

淀粉样纤维能与硫磺素T特异性结合，诱导硫磺素T荧光的强吸收，而多肽单体则没有此作用。ThT实验结果(图1)显示，$PAP_{248\text{-}286}$在PBS中形成淀粉样纤维SEVI，并呈浓度依赖性。

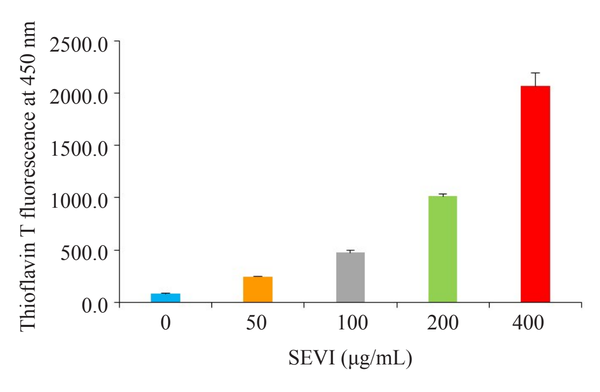


图1 ThT法检测$PAP_{248\text{-}286}$在PBS中形成SEVI淀粉样纤维的情况

Fig.1 SEVI amyloid fibrils formation of $PAP_{248\text{-}286}$ in PBS detected by ThT test. The fluorescence intensities of SEVI (0, 50, 100, 200, 400 μg/mL) were detected by Thioflavin T assay with excitation wavelength at 450 nm.

2.2 SEVI在实验浓度范围内对TZM-bl和CEMx174 5.25M7细胞均没有毒性

对TZM-bl细胞中的MTT实验结果进行One-way ANOVA方差分析，P=0.250，方差齐性，SEVI浓度为0 μg/mL的对照组与其他各浓度组之间的比较采用LSD检验法分析，P>0.05(图2A)，说明SEVI在0~50 μg/mL浓度范围内对TZM-bl细胞没有毒性作用。

同样，对CEMx174 5.25M7细胞中的MTT实验结果进行One-way ANOVA方差分析，P值为0.213(P>0.05)，方差齐性，SEVI浓度为0 μg/mL的对照组与其他各浓度组之间的比较采用LSD法分析，P>0.05(图2B)，说明SEVI在0~50 μg/mL浓度范围内对CEMx174 5.25M7细胞没有毒性作用。

2.3 SEVI能增强CH236 TF和CC HIV-1毒株感染

已有研究表明，精液蛋白PAP的不同片断形成的淀粉样纤维(如SEM1、SEM2、SEVI)能促进普通HIV-1毒株的感染[10, 13-14]。本研究中，我们采用TZM-bl报告系统考察SEVI对TF和CC HIV-1病毒感染有无促进作用。先利用One-way ANOVA进行方差分析，CH236 TF、CH236 CC组P值分别为0.091、0.006。CH236 TF组方差齐性，采用LSD法两两比较；而CH236 CC组方差不齐，采用Dunnett T3检验法。结果表明，TF和CC毒株的结果类似，除了低浓度3.2 μg/mL组与空白对照组没有显著性差异(P>0.05，图3A，图3B)外，浓度为8、20、50 μg/mL的组均与空白对照组有显著性差异(P<0.05，图3A，图3B)，说明SEVI在较高浓度时能以浓度依赖的方式促进TF和CC HIV-1感染靶细胞。

2.4 ADS-J1拮抗SEVI增强CH236 TF和CC HIV-1毒株感染

ADS-J1是具有拮抗SEVI促进普通HIV-1毒株感染的小分子阴离子化合物，前面的实验结果已经验证SEVI对TF和CC HIV-1病毒感染的促进作用，接下来，我们将SEVI的浓度设为20 μg/mL，考察ADS-J1拮抗SEVI增强CH236 TF和CC HIV-1毒株感染的情况。One-way ANOVA方差分析结果表明，CH236 TF组P值为0.112(P>0.05)，方差齐性，采用LSD法两两比较，ADS-J1浓度在0.51、1.28、3.20、8.00、20.00 μg/mL时均显著拮抗SEVI增强CH236 TF病毒感染作用(P<0.05，图4A)。CH236 CC组P值为0.033(P<0.05)，方差不齐，采用Dunnett T3检验法，ADS-J1浓度在1.28、3.20、8.00、20.00 μg/mL时显著拮抗SEVI增强CH236 TF病毒感染作用(P<0.05，图4B)。此实验结果表明，ADS-J1拮抗SEVI增强TF和CC HIV-1感染靶细胞，并呈浓度依赖作用。

2.5 ADS-J1抑制CH236 TF和CC HIV-1毒株感染

gp41是HIV-1跨膜糖蛋白，介导HIV-1与靶细胞融合，从而HIV-1进入细胞内。有研究表明，ADS-J1可以通过抑制gp41六螺旋束结构的形成，进而抑制HIV-1进入靶细胞的作用[12]。我们设计了ADS-J1系列浓度(0.51、1.28、3.20、8.00、20.00、50.00 μg/mL)，考察ADS-J1是否能抑制CH236 TF和CC HIV-1毒株感染TZM-bl细胞。实验结果用One-way ANOVA进行方差分析，CH236 TF组、CH236 CC组的P分别为0.117、0.061(P>0.05)，方差齐性，采用LSD法两两比较，ADS-J1在浓度0.51、1.28、3.20、8.00、20.00、50.00 μg/mL时均显著抑制

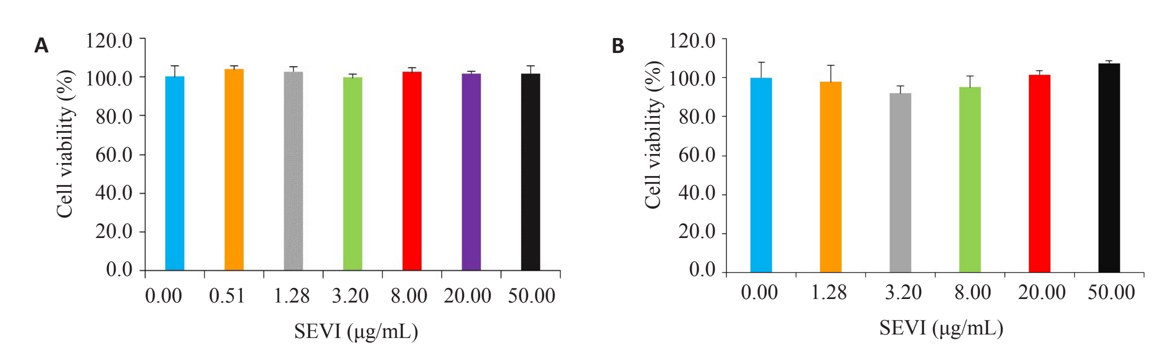


图2 MTT法检测SEVI对TZM-bl细胞及CEMx174 5.25M7细胞的毒性作用

Fig.2 Cytotoxicities of SEVI on TZM-bl (**A**) and CEMx174 5.25M7 cells (**B**) analyzed by MTT assay.

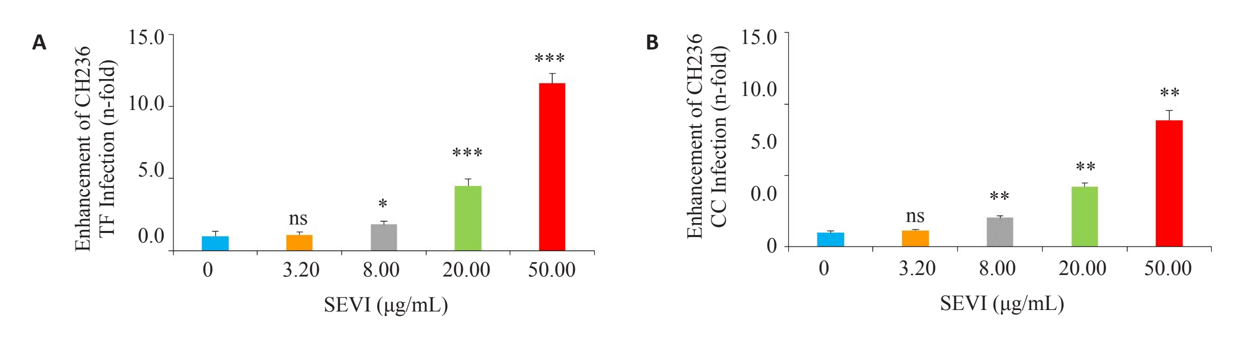


图3 SEVI对CH236 TF和CH236 CC病毒感染的影响

Fig.3 Effect of SEVI on CH236 TF and CH236 CC virus infection. **A**: Enhancement fold of SEVI on CH236 TF analyzed by luciferase activity. **B**: Enhancement fold of SEVI on CH236 CC analyzed by luciferase activity. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 *vs* blank control.

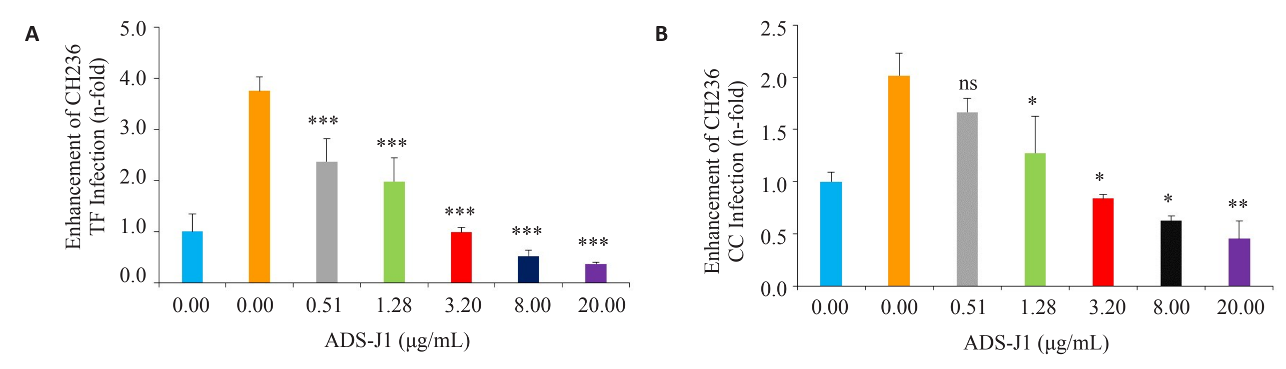


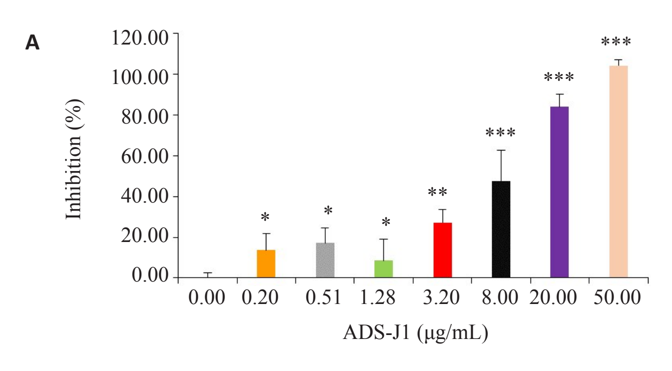
图4 ADS-J1拮抗SEVI增强CH236 TF和CH236 CC病毒感染

Fig.4 Antagonism of ADS-J1 on SEVI-mediated enhancement of CH236 TF and CH236 CC viruses *in vitro*. **A**: Enhancement fold of SEVI treated with ADS-J1 on CH236 TF analyzed by luciferase activity. **B**: Enhancement fold of SEVI treated with ADS-J1 on CH236 CC analyzed by luciferase activity. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 *vs* blank control.

CH236 TF、CC HIV-1毒株感染靶细胞(P<0.05,图5)。以上结果表明,ADS-J1不仅能拮抗SEVI增强CH236 TF、CC HIV-1毒株感染作用,还可以直接抑制病毒感染靶细胞。

2.6 ADS-J1能中和SEVI表面的正电荷

既然ADS-J1本身就能抑制TF和CC HIV-1感染,那么图4中加入ADS-J1后,SEVI促感染作用的降低是两种作用的简单叠加,还是ADS-J1对SEVI的拮抗作用呢?SEVI淀粉样纤维促进HIV感染的作用机制是,纤维富含正电荷,能与带负电荷的病毒粒子结合,拉近病毒与靶细胞之间的距离,从而促进病毒感染[14-15]。ADS-J1为小分子阴离子化合物,我们通过Zeta电位法探讨ADS-J1拮抗SEVI促感染作用的机制。淀粉样纤维富含正电荷,用不同浓度ASD-J1处理SEVI后,检测混合物的Zeta电位。结果显示,SEVI(400 μg/mL)电位为+20.9±0.36 mV,ADS-J1(30 μg/mL)电位为-4.2±0.20 mV。SEVI所带的正电荷被ADS-J1呈浓度依赖性地中和,并在ADS-J1为60 μg/mL时逆转为带负电(图6)。Zeta电位法的结果表明,ADS-J1能中和SEVI表面的正电荷。



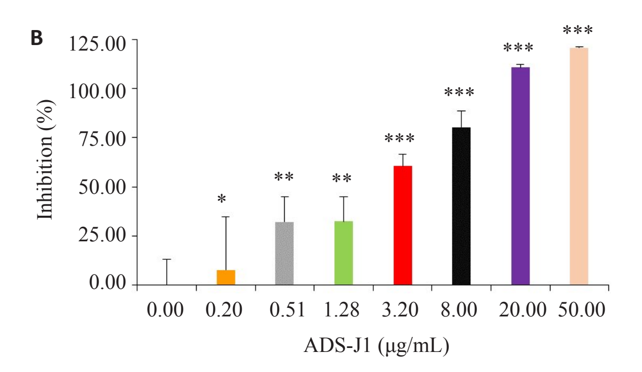


图5 ADS-J1抑制CH236 TF和CC HIV-1毒株感染

Fig.5 ADS-J1 inhibited the infection of CH236 TF and CH236 CC viruses *in vitro*. **A**: Inhibition (%) of CH236 TF viruses treated with indicated concentration of ADS-J1 analyzed by luciferase activity. **B**: Inhibition (%) of CH236 CC viruses treated with indicated concentration of ADS-J1 analyzed by luciferase activity. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 *vs* blank control.

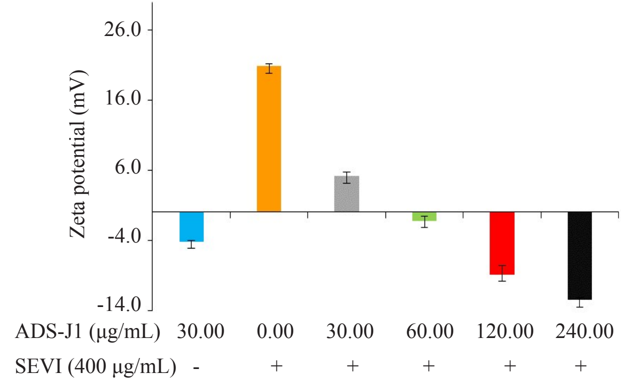


图6 ADS-J1中和SEVI表面的正电荷

Fig.6 ADS-J1 neutralizes the positive charge of SEVI. Zeta potential of SEVI treated with serial concentration of ADS-J1 was detected by Zetasizer Nano ZS90.

3 讨论

性传播已经成为HIV-1的最主要传播方式，生殖道黏膜、直肠或口腔黏膜组织为HIV-1的性传播提供了主要的感染位点[16]，而建立黏膜新感染的毒株为TF病毒，约80%为单株TF感染。男性长期感染者血液内的病毒分泌到精液的过程中，病毒载量和多样性大大减少，但一些毒株仍然可以通过精液传播，可见黏膜瓶颈和先天性免疫并不能完全阻止病毒传播，反而选择出能打破这些屏障的TF优势变异株。研究表明，天然存在于精液中的SEVI能显著增加HIV-1感染，其在精液中含量高达42 μmol/L，约占精液固体蛋白的35%[10, 15]，我们猜测这也为TF传播提供了极有利的条件。目前，尚未有以生殖道为靶点来阻止HIV-1传播的药物上市[13]，其中生殖道局部杀微生物剂是一种很有研发前景的药物，它可以通过直接灭活HIV-1、阻断HIV-1黏附及抑制病毒进入靶细胞，或抑制病毒在靶细胞内复制，增强阴道和子宫的天然免疫反应等多个靶点将HIV-1“扼杀”在摇篮。然而，许多在体外证实有效的局部杀微生物剂，临床试验结果均以失败告终[13]。如前所述，SEVI可能是导致杀微生物剂临床试验失败的罪魁祸首。因此，SEVI和TF、CC毒株可以作为HIV杀微生物剂研发的方向。

本研究中，首先我们在体外将$PAP_{248-286}$多肽溶解在PBS中，在37 ℃下剧烈震荡48 h，ThT实验表明，$PAP_{248-286}$单体浓度依赖性地形成了淀粉样纤维SEVI。剧烈震荡形成SEVI用于后续的病毒感染实验，但精液中SEVI的形成至今没有明确的机制，可能与多肽氨基酸残基间相互作用、介质疏水性、温度、pH、金属离子等有关[17]。

针对HIV R5病毒的实验表明，大量带正电荷的SEVI犹如一张“大网”牢牢捕获带负电的病毒，并且可以降低病毒与细胞膜间的静电排斥，增加了病毒在细胞膜上的粘附率从而促进病毒与靶细胞的融合[14]。然而，SEVI对TF和CC病毒感染能力的影响目前尚不清楚，虽然TF病毒的低糖基化[20]导致它在黏液中相对容易迁移，可能难以被SEVI淀粉样纤维捕获，但是TF病毒的包膜糖蛋白几乎是普通HIV-1的2倍[19]，带正电荷的SEVI可能对病毒与细胞膜上的融合极为有利，因此，我们猜测SEVI可能也会增加TF及其相匹配的CC病毒感染。本研究中，我们利用CH236 TF和CC感染性克隆转染293T细胞获得病毒，进一步的病毒感染实验表明，SEVI确实能增强TF、CC病毒感染靶细胞，增强倍数依次为11.6±0.7和8.9±0.7倍，增强的效果较普通R5毒株的效果弱，这一结果与精液增强病毒感染的结果类似（本课题组数据，未列出），这可能与不同病毒本身的感染能力、病毒稀释的倍数等因素有关。值得一提的是，TF和CC病毒本身的滴度也远低于普通的毒株，两者之间往往相差几个数量级。

ADS-J1是我们课题组采用高通量筛选得到的小分子化合物，它除了抑制SEVI的形成、降解成熟的SEVI，还通过靶向HIV-1 gp41、gp 120阻断病毒进入靶细胞，具有“三重”作用的ADS-J1有望作为先导化合物来研发以SEVI为靶点同时直接抑制病毒感染的杀微

生物剂[12, 20-22]。基于这些研究基础,我们预测ADS-J1也可以拮抗SEVI增强TF、CC毒株感染靶细胞的能力。为了证实这一猜测,我们首先将ADS-J1和SEVI在37 ℃下共孵育,然后与TF及CC病毒混匀后感染TZM-bl细胞,结果证实ADS-J1可以拮抗SEVI增强TF及CC毒株的感染,且拮抗作用呈浓度依赖性。高浓度的ADS-J1甚至将病毒滴度降低至对照值以下,暗示ADS-J1不仅拮抗SEVI增强TF、CC病毒感染,可能还可以直接抑制TF、CC病毒感染靶细胞,接下来我们通过ADS-J1对TF、CC的抗病毒实验证明了这一猜测。如前所述,SEVI表面的正电荷是增强病毒感染的重要原因,ADS-J1是一种阴离子化合物,它能中和SEVI表面的正电荷。为进一步探索ADS-J1拮抗SEVI增强病毒感染的作用机制,我们用不同浓度的ADS-J1处理SEVI,检测其电位,结果证实ADS-J1能浓度依赖性地中和SEVI表面的正电荷。因此,我们认为,SEVI增强TF和CC病毒感染能力的作用机制与增强普通R5病毒感染能力的作用机制是一致的,而ADS-J1通过中和SEVI表面的正电荷而拮抗其增强作用。

本研究利用体外感染模型,初步证实了ADS-J1拮抗SEVI增强TF和CC病毒的感染能力及其作用机制,TF病毒作为有效建立新感染的毒株,我们认为这一结果比SEVI增强其他普通HIV-1毒株感染对于黏膜传播过程的了解更具参考意义。然而,鉴于体内环境的复杂性,需要进一步的体内实验或利用模拟体内环境的模型才能更好地了解TF病毒的传播机制,以寻求阻断TF病毒感染机体的有效方法。

参考文献:

[1] Gray RH, Wawer MJ, Brookmeyer R, et al. Probability of HIV-1 transmission per coital act in monogamous, heterosexual, HIV-1-discordant couples in Rakai, Uganda[J]. Lancet, 2001, 357 (9263): 1149-53.

[2] Padian NS, Shiboski SC, Glass SO, et al. Heterosexual transmission of human immunodeficiency virus (HIV) in northern California: results from a ten-year study[J]. Am J Epidemiol, 1997, 146 (4): 350-57.

[3] Derdeyn CA, Decker JM, Bibolletruche F, et al. Envelope constrained neutralization sensitive HIV-1 after heterosexual transmission[J]. Science, 2004, 303: 2019-22.

[4] Haaland RE, Hawkins PA, Salazargonzalez J, et al. Inflammatory genital infections mitigate a severe genetic bottleneck in heterosexual transmission of subtype A and C HIV-1[J]. PLoS Pathog, 2009, 5: e1000274.

[5] Frater AJ, Edwards CT, McCarthy N, et al. Passive sexual transmission of human immunodeficiency virus type 1 variants and adaptation in new hosts[J]. J Virol, 2006, 80: 7226-34.

[6] Keele BF, Giorgi EE, Salazar-Gonzalez JF, et al. Identification and characterization of transmitted and early founder virus envelopes in primary HIV-1 infection[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105 (21): 7552-7.

[7] Abrahams MR, Anderson JA, Giorgi EE, et al. Quantitating the multiplicity of infection with human immunodeficiency virus type 1 subtype C reveals a non-Poisson distribution of transmitted variants[J]. J Virol, 2009, 83: 3556-67.

[8] Iyer SS, Bibollet-Ruche F, Sherrill-Mix S, et al. Resistance to type 1 interferons is a major determinant of HIV-1 transmission fitness[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(4): E590-9.

[9] Carlson JM, Schaefer M, Monaco DC, et al. HIV transmission. Selection bias at the heterosexual HIV-1 transmission bottleneck[J]. Science, 2014, 345(6193): 1254031.

[10] Munch J, Rucker E, Standker L, et al. Semen-derived amyloid fibrils drastically enhance HIV infection[J]. Cell, 2007, 131(6): 1059-71.

[11] Boeras DI, Hraber PT, Hurlston M, et al. Role of donor genital tract HIV-1 diversity in the transmission bottleneck[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(46): E1156-63.

[12] Xun T, Li W, Chen J, et al. ADS-J1 inhibits semen-derived amyloid fibril formation and blocks fibril-mediated enhancement of HIV-1 infection[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(9): 5123-34.

[13] Arnold F, Schnell J, Zirafi O, et al. Naturally occurring fragments from two distinct regions of the prostatic acid phosphatase form amyloidogenic enhancers of HIV infection[J]. J Virol, 2012, 86(2): 1244-9.

[14] Roan NR, Münch J, Arhel N, et al. The cationic properties of SEVI underlie its ability to enhance human immunodeficiency virus infection[J]. J Virol, 2009, 83 (1):73-80.

[15] Yolamanova M, Meier C, Shaytan AK, et al. Peptide nanofibrils boost retroviral gene transfer and provide a rapid means for concentrating viruses[J]. Nat Nanotechnol, 2013, 8(2): 130-6.

[16] Smith-McCune K, Chen JC, Greenblatt RM, et al. Unexpected inflammatory effects of intravaginal gels (Universal Placebo Gel and Nonoxynol-9) on the upper female reproductive tract: A randomized crossover study[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0129769.

[17] Sheftic SR, Snell JM, Jha S, et al. Inhibition of semen-derived enhancer of virus infection (SEVI) fibrillogenesis by zinc and copper[J]. Eur Biophys J, 2012, 41(9): 695-704.

[18] Frost SD, Liu Y, Pond SL, et al. Characterization of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope variation and neutralizing antibody responses during transmission of HIV-1 subtype B[J]. J Virol, 2005, 79(10): 6523-7.

[19] Parrish NF, Gao F, Li H, et al. Phenotypic properties of transmitted founder HIV-1[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(17): 6626-33.

[20] Wang H, Qi Z, Guo A, et al. ADS-J1 Inhibits Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry by Interacting with the gp41 Pocket Region and Blocking Fusion-Active gp41 Core Formation[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(12): 4987-98.

[21] Yu F, Lu L, Liu Q et al. ADS-J1 inhibits HIV-1 infection and membrane fusion by targeting the highly conserved pocket in the gp41 NHR-trimer[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1838: 1296-305.

[22] González-Ortega E, Mena M-P, Permanyer M, et al. ADS-J1 Inhibits HIV-1 entry by interacting with gp120 and does not block fusion-active gp41 core formation [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(10): 4487-92.